

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Anja Lauder

6766/ BT

Predobrada kukuruzovine za proizvodnju bioetanola

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biokemijsko inženjerstvo

Mentor: prof. dr.sc. Božidar Šantek

Zagreb, 2016.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu u sklopu projekta „Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9158) pod vodstvom prof. dr. sc. Šanteka, a dr. sc. Antonija Trontel i dr. sc. Mario Novak su sudjelovali kao pomoć u izradi.

ZAHVALE

Zahvaljujem se svojem mentoru izv. prof. dr. sc. Božidaru Šanteku na predloženoj temi i pomoći prilikom izrade ovog završnog rada.

Posebno se zahvaljujem asistentima dr. sc. Antoniji Trontel, dr.sc. Mariju Novaku i dr.sc. Mladenu Pavlečiću na izrazitoj pomoći i savjetima, strpljenju te dobroj atmosferi tijekom cijelog trajanja izrade završnog rada.

Zahvaljujem se Igoru Livadi, tehničkom suradniku Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo jer je uvijek bio u blizini kada nam je trebala i najmanja pomoć.

Zahvaljujem se svojim kolegama Dariji, Franu te skorom mag.ing.bioproc. Alenu Kostiću jer su učinili izradu ovog rada puno lakšom i zabavnijom.

Konačno, zahvaljujem se Matiji Cvetku na velikoj podršci i strpljenju, Veroniki Matoković i svim ostalim prijateljima koji su cijelo ovo vrijeme bili uz mene...

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Predobrada kukuruzovine za proizvodnju bioetanola

Anja Lauder, 6766/BT

Sažetak: Cilj ovog rada bio je provesti predobradu kukuruzovine u visokotlačnom reaktoru za termičku predobradu lignoceluloznih sirovina pri različitim uvjetima procesa (vremena zadržavanja i koncentracije H_2SO_4) te pri konstantnoj temperaturi od $210^{\circ}C$ i tlaku pare od 20 bara. Analizom dobivenih hidrolizata trebalo je zaključiti pri kojim se procesnim uvjetima postižu najbolji rezultati. Nakon predobrade sirovine dobivene su čvrsta i tekuća faza, svaka je faza analizirana zasebno i u svakoj fazi identificirani su različiti ugljikohidrati i nusprodukti te su određene njihove koncentracije pomoću kromatografije visoke djelotvornosti. Korištenjem 1,0 %-tne H_2SO_4 , pri vremenu zadržavanja od 5 minuta dobiveni su najveći udjeli fermentabilnih šećera, 4,1 % glukana, 5,9 % ksilana i 1,2 % arabinana, no dobiveni su relativno veliki udjeli toksičnih nusprodukata: 5,4 % mravlje, 2,7 % octene i 8,4 % levulinske kiseline. U daljnjem istraživanju korištena je koncentracija kiseline od 0,5 % pri čemu su rezultati pokazali najveću konverziju komponenti kukuruzovine u fermentabilne šećere, dobiveno je 4,8 % glukana, 4,7 % ksilana i 1,5 % arabinana. Pri ovim uvjetima smanjen je i udio toksičnih tvari na svega 3,5 % mravlje, 1,9 % octene i 0,6 % levulinske kiseline.

Ključne riječi: lignocelulozna sirovina, predobrada, tretman parom, kukuruzovina

Rad sadrži: 28 stranica, 20 slika, 5 tablica, 41 literaturni navod, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (word format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr.sc. Božidar Šantek

Pomoć pri izradi: dr. sc. Mladen Pavlečić

Rad predan: rujan, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing

Pretreatment of corn stover for bioethanol production

Anja Lauder 6766/BT

Abstract: The goal of this research was to examine pretreatment of corn stover in high-pressure reactor for thermic pretreatment of lignocellulose raw materials under different conditions (retention time and concentration of H_2SO_4) and constant temperature of 210°C and pressure of 20 bars. Results of pretreatment were liquid and solid phase, each phase was then individually analyzed and in each phase different carbohydrates and by-products were identified together with their concentration. Using 1 % sulphuric acid the highest content of fermentable sugars was obtained with 5 min retention time, 4,1 % glucan, 5,9 % xylan and 1,2 % arabinan, but the amount of toxic compounds was relatively high: 5,4 % formic, 2,7 % acetic and 8,4 % levulinic acid. In further research, 0,5 % H_2SO_4 was used and then the results showed even higher gain of fermentable sugars, 4,8 % glucan, 4,7 % xylan and 1,54 %. Under this conditions the amount of toxic compounds was reduced to 3,5 % formic, 1,9 % acetic and 0,6 % levulinic acid.

Keywords: lignocellulosic raw material, corn stover, pretreatment, steam treatment..

Thesis contains: 28 pages, 20 figures, 5 tables, 41 references, 2 supplement

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (word format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD Božidar Šantek, Full Professor*

Technical support and assistance: dr. sc. Mladen Pavlečić

Thesis delivered: september, 2016.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Lignocelulozne sirovine.....	2
2.1.1. Kukuruzovina.....	3
2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina	5
2.2.1. Tretman parom	6
2.3. Nastajanje inhibitora tijekom procesa predobrade lignoceluloznih sirovina	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.1. Sirovina	10
3.1.2. Kemikalije	11
3.1.3. Aparatura i pribor.....	12
3.1.3.1. Mlin čekičar.....	12
3.1.3.2. Uređaj za termičku predobradu lignoceluloznih sirovina	13
3.1.3.2.1 Princip rada uređaja za termičku predobradu lignoceluloznih sirovina.....	13
3.1.3.3. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti.....	14
3.1.3.4. Ostala oprema.....	14
3.2. METODE RADA.....	15
3.2.1. Priprema sirovine.....	15
3.2.2. Određivanje sastava kukuruzovine.....	15
3.2.3. Tretman parom u uređaju za termičku predobradu lignoceluloznih sirovina	15
3.2.4. Analitičke metode.....	16
3.2.4.1. Dvostupanjska kiselinska hidroliza.....	17
3.2.4.2. Određivanje udjela suhe tvari u uzorcima sirovina.....	17
3.2.4.3. Određivanje udjela lignina topljivog u kiselini	18

3.2.4.4. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini.....	18
3.2.4.5. Određivanje furfurala spektrofotometrijski.....	18
3.2.5. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti...	19
3.2.5.1. Priprema uzorka tekuće faze za analizu HPLC metodom.....	19
3.2.5.2. Priprema uzorka čvrste faze za analizu HPLC metodom.....	19
3.2.5.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	19
3.2.5.3.1. Izrada baždarnog pravca za određivanje koncentracija šećera i kiselina.....	20
4. REZULTATI.....	21
4.1. Analiza kukuruzovine.....	22
4.2. Analiza tekuće faze hidrolizata kukuruzovine.....	23
4.3. Analiza čvrste faze hidrolizata kukuruzovine.....	24
5. RASPRAVA.....	25
5.1. Analiza kukuruzovine.....	25
5.2. Analiza tekuće faze hidrolizata kukuruzovine.....	25
5.4. Analiza čvrste faze hidrolizata kukuruzovine.....	26
6. ZAKLJUČAK.....	28
7. LITERATURA.....	29
8. PRILOZI.....	33

UVOD

1. UVOD

Upotreba lignoceluloznih sirovina u proizvodnji biogoriva je posebno interesantna zbog široke rasprostranjenosti, dostupnosti i obnovljivosti lignoceluloznih materijala. Za proizvodnju ovih vrsta sirovina nije potrebno dodatno iskorištavanje obradivih površina koje se inače koriste za proizvodnju hrane, već se biogoriva proizvode iz dijela koji se ne može koristiti u prehrambenoj industriji (Kleinert i Barth, 2008; Ohman i sur., 2006). Lignocelulozna biomasa, poput kukuruzovine je potencijalna sirovina za proizvodnju bioetanola. Predobrada je ključni korak u postizanju efikasne konverzije lignocelulozne biomase u fermentabilne šećere i konačno u etanol. Kukuruzovina i ostale lignocelulozne sirovine se sastoje od 3 glavne komponente: celuloze, hemiceluloze i lignina (Bondesson i sur., 2013).

Svrha postupka predobrade je hidroliza hemiceluloze, uklanjanje lignina i prevođenje kristalične celuloze u amorfni oblik pogodan za enzimsku hidrolizu. Ovaj korak predstavlja najveći izazov u proizvodnji jer je potrebno odabrati najefikasniju metodu koja će u konačnici biti i novčano isplativa (Sun i Cheng, 2002). Metode predobrade se generalno mogu podijeliti u četiri kategorije: (i) fizikalne (mljevenje, zračenje, tretman parom, piroliza), (ii) kemijske (kiseline, lužine, organska otapala), (iii) fizikalno-kemijske te (iv) biološke metode (Alriksson, 2006). Nastajanje nusproizvoda tijekom predobrade ovisi o vrsti lignocelulozne sirovine i korištenoj metodi. Spojevi koji mogu djelovati kao inhibitori rasta i aktivnosti radnim mikroorganizmima su fenolni spojevi i drugi aromatski spojevi, alifatske kiseline, furan aldehidi, anorganski ioni, alkoholi i drugi proizvodi fermentacije (Jonsson i sur., 2013)

Cilj ovog rada bio je provesti predobradu kukuruzovine u visokotlačnom reaktoru pri različitim uvjetima procesa. Tijekom postupka predobrade temperatura i tlak vodene pare bili su konstantni, a promijenljivi parametri postupka predobrade su vrijeme zadržavanja i koncentracija sumporne kiseline. Određena je efikasnost postupka predobrade uspoređujući koncentracije fermentabilnih šećera i nusprodukata u dobivenim hidrolizatima.

TEORIJSKI DIO

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Lignocelulozne sirovine

Lignocelulozne sirovine su nusproizvodi drvne industrije (npr. ostaci drva, piljevina) i poljoprivredne proizvodnje (pšenični, kukuruzni, repini ostatci, sijeno, zelena i suha trava). Ove sirovine značajno su jeftinije od šećernih i škrobnih sirovina, ali su tehnološki zahtjevnije za proizvodnju biogoriva (Rezić, 2012). Osim za proizvodnju biogoriva, mogu se upotrijebiti za proizvodnju enzima te drugih proizvoda visoke vrijednosti kao što su različite biokemikalije (Anwar i sur., 2014).

Lignoceluloza se generalno može podijeliti na tri glavne komponente: celulozu (30-50%), hemicelulozu (15-35%) i lignin (10-20%) (Pettersen, 1984). Celuloza i hemiceluloza čine prosječno 70% cjelokupne mase te su čvrsto povezane sa ligninom putem kovalentnih i vodikovih veza koje čine strukturu vrlo robusnom i otpornom na različite metode predobrade i hidrolize (Knauf i sur., 2004). Udio navedenih komponenti (celuloze, hemiceluloze i lignina) varira ovisno o vrsti sirovine. U tablici 1. je prikazana razlika u sastavu nekih lignoceluloznih sirovina tipičnih za hrvatsko područje.

Tablica 1. Udio celuloze, hemiceluloze i lignina u nekim poljoprivrednim ostacima (Lee i sur., 2007; Pointner i sur., 2014).

lignocelulozni materijal	celuloza (%)	hemiceluloza (%)	lignin (%)
kukuruzovina	38	26	19
kukuruzni oklasak	38,8	44,4	11,9
pšenična slama	38	29	15

Celuloza je linearni polimer kojeg čine dugi lanci glukoznih jedinica povezanih β -1,4-glikozidnim vezama. Jednu molekulu celuloze može činiti i do 10 000 glukoznih podjedinica (Saha, 2003). Molekule celuloze su u staničnoj stijenci biljaka povezane vodikovim vezama i tvore mikrovlakna koja povezivanjem u vlakna osiguravaju čvrstu i kompaktnu strukturu. Celuloza se u lignoceluloznim sirovinama nalazi uglavnom u kristaličnom obliku, dok je mali

udio celuloze amorfne strukture koja je dostupna djelovanju celololitičkih enzima (Ragauskas, 2014.).

Hemiceluloza je razgranati polimer koji se sastoji od kratkih lanaca različitih pentoza i heksoza, pri čemu je ksiloza najzastupljeniji šećer. Od ostalih pentoza hemiceluloza sadrži arabinozu, a od heksoza galaktozu, glukozu i manozu. Uz šećere sadrži i mali udio acetilnih i metilnih grupa. Zbog svoje razgranate, amorfne strukture ju je relativno lako hidrolizirati. U lignoceluloznim materijalima, hemiceluloza djeluje kao „ljepilo“ između celuloze i lignina (Fengel i Wegener, 1984).

Lignin je veliki kompleksni polimer koji u biljkama osigurava mehaničku čvrstoću stanične stijenke (Ragauskas, 2014). Sastavljen od fenilpropanskih jedinica povezanih eterskim ili C-C vezama. Fenilpropanske jedinice se još nazivaju i monolignolni monomeri, pri čemu su najzastupljenije tri vrste: *p*-kumaril, koniferil i sinapil alkohol (Rowell i sur., 2005). Lignin povezuje hemicelulozu i snopove celuloze u strukturu lignoceluloze te zbog toga djeluje kao fizikalna barijera enzimskoj hidrolizi (Anwar i sur., 2014). Faktori koji otežavaju hidrolizu sirovina su zastupljenost lignina u sirovini, stupanj i vrsta veza između lignina i ostalih polisaharida te raspodjela fenilpropanskih jedinica u samoj strukturi lignina (Ragauskas, 2014). Za razliku od celuloze i hemiceluloze, ne može se iskoristiti za proizvodnju bioetanol. S obzirom da njegova prisutnost smanjuje enzimatsku razgradljivost lignoceluloze, potrebno ga je na odgovarajući način ukloniti (Anwar i sur., 2014).

2.1.1. Kukuruzovina

Kukuruzovina je poljoprivredni nusproizvod koji se dobije nakon berbe kukuruza. Može se koristiti za ekonomski isplativu proizvodnju bioetanol jer je široko rasprostranjena i dostupna u velikim količinama uz relativno nisku prodajnu cijenu (Varga i sur., 2004). Prosječan sastav dozrijele biljke kukuruza u vrijeme berbe je: zrno (45,9 %), stabljika (27,5 %), list (11,4 %), oklasak (8,2 %) i komušina (7,0%), odnosno 46% zrno : 54% kukuruzovina. (Pordesimo i sur., 2005). Zbog toga kukuruzovina (Slika 1.) uz ostale otpatke tijekom berbe kukuruza pripada jednom od najvažnijih poljoprivrednih ostataka svake zemlje koja uzgaja kukuruz, pa tako i Hrvatske (Varga i sur., 2004).



Slika 1. Kukuruzovina nakon berbe kukuruza

Kukuruzovina, kao i svaki lignocelulozni materijal je otporna na enzimatsku hidrolizu zbog čvrste mreže lignoceluloznog kompleksa i kristalične strukture celuloze. Rješenje ovog problema je pronalaženje odgovarajuće metode za predobradu (Varga i sur., 2004). Analiza sastava kukuruzovine prikazana je u Tablici 2.

Tablica 2. Detaljna sastavna analiza kukuruzovine prikazana kao udio pojedine komponente u suhoj tvari (Lee i sur., 2007).

kukuruzovina	srednja vrijednost (%)
Celuloza	37,5
Glukan	37,5
Hemiceluloza	26,1
Ksilan	21,7
Arabinan	2,7
Galaktan	1,6
Manan	0,6
Ukupni lignin	18,9
Topivi lignin	2,9
Netopivi lignin	16,4
Pepeo	6,3

2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Zbog kompleksnosti strukture lignoceluloznih sirovina najveći izazov u proizvodnji biogoriva je upravo predobrada biomase (Demirbas, 2005). Ciljevi učinkovite predobrade su izravno dobivanje šećera ili naknadno putem hidrolize, izbjegavanje gubitka i/ili degradacije formiranih šećera, smanjenje nastanka inhibitornih proizvoda te smanjenje energetske troškova kako bi se minimalizirali ukupni troškovi proizvodnje. Metode predobrade lignoceluloznih sirovina mogu se podijeliti na:

- (i) fizikalne metode,
- (ii) kemijske metode,
- (iii) fizikalno-kemijske metode,
- (iv) biološke metode (Sarkar i sur., 2012).

Fizikalnim metodama pripadaju mljevenje, zračenje, tretman γ -zrakama, ekstruzija, ekspanzija, piroliza te tretman parom. Utvrđeno je da se ovim metodama osigurava povećanje površine i pora lignocelulozne sirovine, smanjuje kristaličnost celuloze te se djelomično ili potpuno hidrolizira hemiceluloza. Glavni nedostatak fizikalnih metoda predobrade je veliki utrošak energije i slaba delignifikacija (Alvira i sur., 2010).

Kemijske metode obuhvaćaju korištenje koncentriranih ili razrijeđenih kiselina poput klorovodične, dušične, fosfatne ili sumporne, lužina kao što su amonijak ili natrijev hidroksid te organske kiseline, ionske tekućine ili ozonolizu (Han, 2009). Prednosti ovih metoda su: velika efikasnost, povećanje površine i pora lignocelulozne sirovine, djelomična delignifikacija, smanjenje stupnja polimerizacije, djelomična ili potpuna hidroliza hemiceluloze. Nedostatak ovih metoda je upotreba agresivnih kemikalija koje je potrebno zbrinuti na odgovarajući način, kao i ulaganje u skupu procesnu opremu koja mora biti otporna na njihovo djelovanje. Osim toga nakon predobrade je potrebno i provesti neutralizaciju dobivenog hidrolizata (Rezić, 2012).

Fizikalno-kemijske metode predstavljaju kombinaciju gore navedenih metoda. Neke od ovih metoda poput eksplozije vodenom parom, amonijakom ili CO_2 i tretman vrućom vodom se provode bez prisustva agresivnih kemikalija te zbog toga nastaju relativno niske koncentracije inhibitora. Osim toga, zahtijevaju manji utrošak energije te nije potrebno davati veliku pozornost zbrinjavanju kemikalija i procesnoj opremi otpornoj na njihovo djelovanje. Nedostatak ovih metoda je smanjena uspješnost hidrolize hemiceluloze te manji prinos glukoze u odnosu na ostale metode (Eggeman i Elander, 2005).

Biološke metode preobrade lignoceluloze obuhvaćaju predobradu enzimima ili mikroorganizmima koji mogu razgrađivati lignocelulozu. Industrijski enzimi poput celulaza i ksilanaza ili lignolitičkih enzima (lakaza, lignin i manganaza peroksidaza) se koriste za razgradnju komponenti lignoceluloze, uključujući i lignin (Lopez i sur., 2007). Mikroorganizmi koji se koriste za razgradnju lignoceluloze su plijesni (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus awamori*, *Trichoderma viride*) i saprofitne gljive (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia subserialis*, *Ceriporia lacerata*) koje razgrađuju lignin i hidroliziraju hemicelulozu (Sun i Cheng, 2002; Saritha i sur., 2012). Postupci biološke preobrade su ekološki i ekonomski prihvatljivi, koriste se manje količine kemikalija, a uvjeti bioprocasa su relativno blagi u odnosu na ostale metode preobrade. Nedostatci ovih metoda su nizak stupanj hidrolize u većini postupaka i duže trajanje samog procesa u odnosu na ostale metode (Sun i Cheng, 2002; Saritha i sur., 2012).

2.2.1. Tretman parom

Do sad je prepoznato da je najbolja predobrada lignoceluloznih sirovina ostvarena kombiniranjem fizikalnih i kemijskih metoda, pa je tako tretman parom, uz ili bez brze dekompresije (eksplozije) jedna od najuspješnijih metoda za predobradu lignocelulozne sirovine (Ramos, 2003). U daljnjem tekstu će biti obrađen tretman parom bez eksplozije. Tretman parom se uglavnom provodi uz dodatak kiseline kao katalizatora hidrolize, najčešće se koriste sumporna kiselina ili SO_2 te se provodi pri različitim uvjetima procesa- temperature pare, vremena zadržavanja, koncentracije H_2SO_4 i tlaka. Prednosti ove metode su dobro otapanje hemiceluloze i odvajanje lignina, visok prinos glukoze i hemiceluloze u dvostupanjskom procesu te nizak trošak preobrade. Glavni nedostaci su vezani uz parcijalnu degradaciju hemiceluloze i nastajanje toksičnih spojeva. Pri čemu se još uvijek ne može točno definirati da li visoka temperatura i kratko vrijeme zadržavanja daju bolje rezultate od nižih temperatura i dužeg vremena zadržavanja, već to ovisi o strategiji preobrade i sirovini koja se koristi (Ramos, 2003). U sljedećoj tablici 3. su prikazani neki od do sada provedenih tretmana parom i tretmana vrućom vodom na različitim sirovinama i sa pripadajućim uvjetima.

Tablica 3. Vrste predobrade različitih sirovina sa pripadajućim uvjetima

Metoda	Vrsta sirovine	Temperatura [°C]	Vrijeme zadržavanja [min]	Katalizator	Količina dodane sirovine/ omjer tekuće i čvrste faze / udio suhe tvari	Referenca
Eksplozija parom	kukuruzovina	190-210	5-10	H ₂ O 0,2 % (w/w) H ₂ SO ₄ 0,5 % (w/w) H ₂ SO ₄	50% suhe tvari 45-50% suhe tvari 400 g suhe tvari/ 10L fermentor	Bondessin i sur, 2013.
	pšenična slama	190	10	0,2 % (w/w) H ₂ SO ₄	20 g otopine/1g suhe slame	Kovacs i sur, 2009.
	ječmena slama	140-180	5-10	H ₂ O	maseni udio vode 8-50%	Iroba i sur, 2014.
	kukuruzni oklasak	1. faza 150 2. faza 205	55 6,7	0,8 % (w/w) H ₂ SO ₄ H ₂ O	50-80% udio vlage	WO2013013318
Tretman parom (bez eksplozije)	pšenična slama	160-200	10-20	H ₂ O	1040g pred-namočene slame /15 L fermentor	Eisenhuber i sur, 2013.
Tretman vrućom vodom	pšenična slama	200	10	H ₂ O	omjer voda: biomasa 10:1 (w/w)	Hendricks i Zeeman, 2009.
	kukuruzovina	170-200	5-20	H ₂ O	omjer voda: biomasa 6:1 (w/w)	Mosier i sur, 2005.

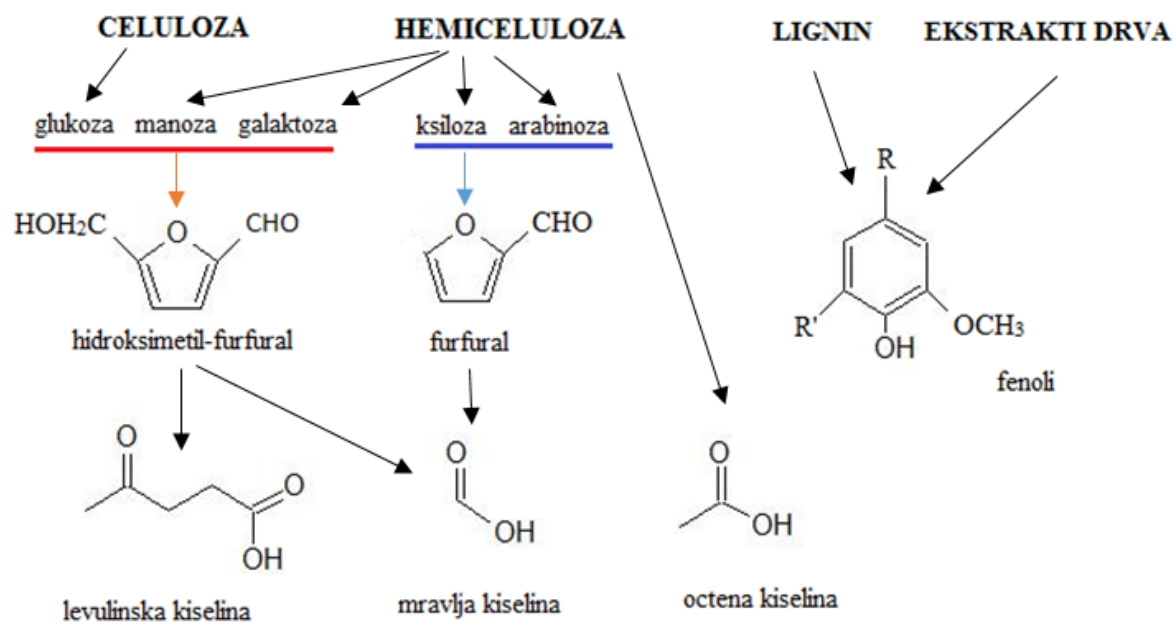
2.3. Nastajanje inhibitora tijekom procesa predobrade lignoceluloznih sirovina

Tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina razgradnjom hemiceluloze nastaje velika količina ugljikohidrata, uglavom pentoza. Osim jednostavnih ugljikohidrata nastaje i veliki broj toksičnih spojeva koji mogu imati inhibitorni učinak na aktivnost enzima ili mikroorganizma. Na sastav i količinu toksičnih spojeva u hidrolizatima značajno utječe odabrana metoda predobrade lignocelulozne sirovine.

Spojevi koji imaju inhibitorni učinak na rast i aktivnost radnog mikroorganizma mogu se podijeliti na: (i) slabe kiseline (octena kiselina, mravlja kiselina i levulinska kiselina); (ii) furane (furfural i HMF); (iii) fenolne spojeve (Jiang i sur., 2016).

Fenolni spojevi, točnije, fenolni spojevi s niskom molekulskom masom imaju veći inhibitorni učinak na radni mikroorganizam od furfurala i HMF-a, ali zbog vrlo niske koncentracije ovih spojeva u hidrolizatu je vrlo teško ispravno odrediti utjecaj ovih spojeva na radni mikroorganizam (Jiang i sur., 2016).

Kako bi se proces mogao optimirati, bitno je razumjeti što se događa sa šećerima pri određenim uvjetima tretmana parom. Pri temperaturama višim od 160°C može doći do dehidracije pentoza u furfural i heksoza u hidroksimetil-furfural, ovi procesi se mogu djelomično minimalizirati spuštanjem pH na 2,0-2,5 (Baugh i sur., 1988). S obzirom da su ti spojevi nestabilni, pri visokim temperaturama i niskom pH se degradiraju u levulinsku i mravlju kiselinu. Nastajanje nusprodukata prikazano je na slici 2. Osim toga, korištenjem kiselog katalizatora tijekom tretmana dolazi do depolimerizacije lignina i nastajanja fenolnih spojeva (Kavanagh i Pepper, 1995).



Slika 2. Nastajanje nusprodukata tijekom termičke obrade lignoceluloznih sirovina

EKSPERIMENTALNI DIO

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovina

Korištena lignocelulozna sirovina bila je kukuruzovina, uzgojena na području Ludbrega. Sirovina je usitnjena na mlinu čekičaru (poglavlje 3.1.3.1.), a usitnjena sirovina koja je korištena za predobradu u visokotlačnom reaktoru prikazana je na slici 3.



Slika 3. Kukuruzovina usitnjena na mlinu čekičaru.

3.1.2. Kemikalije

Tablica 4. Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripravu otopina i standarda za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

kemikalija	čistoća	proizvođač
celobioza	p.a.	Molekula, UK
glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
ksiloza	≥99 %, za biokemiju	Roth, Njemačka
arabinoza	za mikrobiologiju	Kemika, Hrvatska
levulinska kiselina	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
octena kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
mravlja kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
furfural	p.a.	Sigma- Aldrich, Njemačka
cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
demineralizirana voda	p.a.	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
fosfatna kiselina	p.a., za HPLC	Fluka, Njemačka
kalcijev hidroksid	p.a.	Kemika, Hrvatska
sumporna kiselina	min. 96%, p.a.	Kemika, Hrvatska
Ca(OH) ₂	50%, tehnički	Proizvodnja gašenog vapna, Hrvatska

3.1.3. Aparatura i pribor

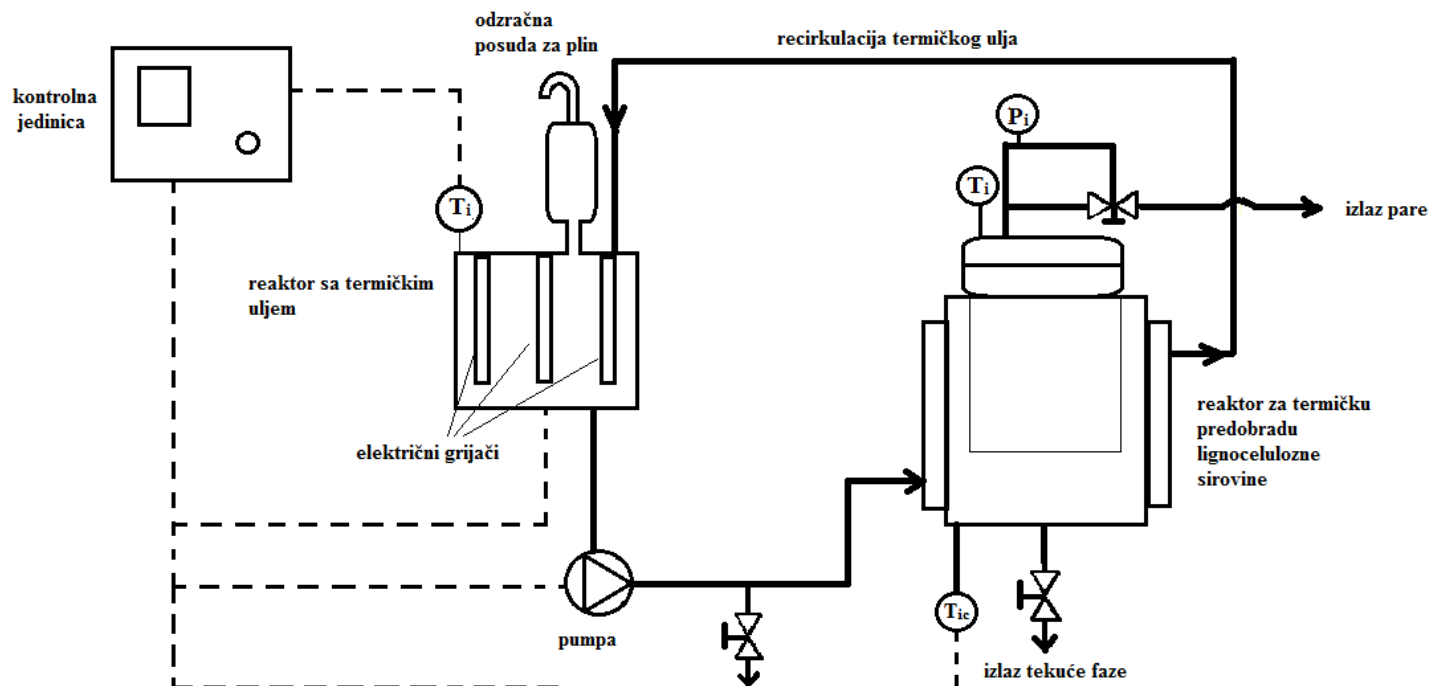
3.1.3.1. Mlin čekičar

Za usitnjavanje lignocelulozne sirovine korišten je mlin čekičar –tip NA45. Mlin pokreće trofazni motor. Kapacitet mljevenja u zrnu iznosu 300 kg/h, a kapacitet mljevenja u klipu iznosi 250 kg/h. Ovaj mlin ima dvije vrste sita, veličine 12 mm i veličine 5 mm. Za usitnjavanje kukuruzovine korišteno je sito veličine 5 mm.



Slika 4. Mlin čekičar –tip NA45(Megamet d.o.o., Nedelišće, Hrvatska)

3.1.3.2. Uređaj za termičku predobradu lignoceluloznih sirovina



Slika 5. Shema visokotlačnog reaktora za termičku predobradu lignocelulozne sirovine

(Legenda: T_i – temperatura pare/ulja, P_i – tlak pare u reaktoru, T_{1c} – regulacija temperature pare)

3.1.3.2.1 Princip rada uređaja za termičku predobradu lignoceluloznih sirovina

Sirovina se stavlja u metalnu poroznu košaru koja se nalazi u reaktoru zapremnine 20 L, zatim se ulijeva 10 L razrijeđene kiseline te se sadržaj promiješa. Nakon zatvaranja reaktora uključuje se sustav na kontrolnoj jedinici, čime započinje grijanje termičkog ulja u drugoj reaktorskoj posudi preko 3 električna grijača. Reaktor za obradu sirovine se grije vrućim uljem preko plašta, uključivanjem sustava uključuje se i pumpa koja recirkulira ulje kroz cijeli sustav. Nadzor procesa se vrši mjerenjem temperature ulja, temperature i tlaka u reaktoru sa sirovinom te temperature vodene pare nastale tijekom zagrijavanja. Nakon završetka procesa kod zadanih uvjeta pomoću ventila na izlazu pare spušta se tlak na atmosferski, tekući dio se ispušta otvaranjem ventila za ispušt na dnu reaktora, a kruti dio se vadi s košarom iz reaktora.

3.1.3.3. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

(eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

Koncentracije šećera glukoze, ksiloze, arabinoze i celebioze, nusprodukata mravlje, octene i levulinske kiseline te furana u izuzetim uzorcima određene su pomoću kromatografa Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu, Kyoto, Japan). Sustav se sastoji od crpke (LC-10A_{VP}), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10 A_{VP}), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A_{VP}), ionsko-izmjenjivačke analitičke kolone (SupelcogelTM C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 µm) s predkolonom (SupelcogelTM H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 µm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-19A_{VP}) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).

3.1.3.4. Ostala oprema

- analitička vaga Shimadzu (Kyoto, Japan);
- mlin za kavu
- mikser EV-100, Tehnica (Železniki, Slovenija);
- pH metar 744, Metrohm (Herisau, Švicarska);
- sušionik Instrumetarija ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- tehnička vaga Tehnica (Železniki, Slovenija);
- osobno računalo s programskim paketom Windows XP Professional.
- Oprema za filtraciju otopina [najlonski filter (0,22 µm, 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Michigan, SAD) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD)]
- UV/Vis spektrofotometra Cary 13E Varian (Mulgrave, Australija).
- kvarcne kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka),
- centrifuga Harrier 18/10 (Sanyo, Watford, Velika Britanija).
- hladnjak i zamrzivač

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema sirovine

Kukuruzovina je usitnjena u mlinu čekićaru–tip NA45. Usitnjena kukuruzovina prosijana je kroz sito veličine otvora od 5 mm te je čuvana pri sobnoj temperaturi u zatvorenoj kartonskoj kutiji.



Slika 6. Usitnjena kukuruzovina u visokotlačnom reaktoru za predobradu lignoceluloznih sirovina.

3.2.2. Određivanje sastava kukuruzovine

Sastav kukuruzovine je određen dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom na način opisan u poglavlju 3.2.3.1.

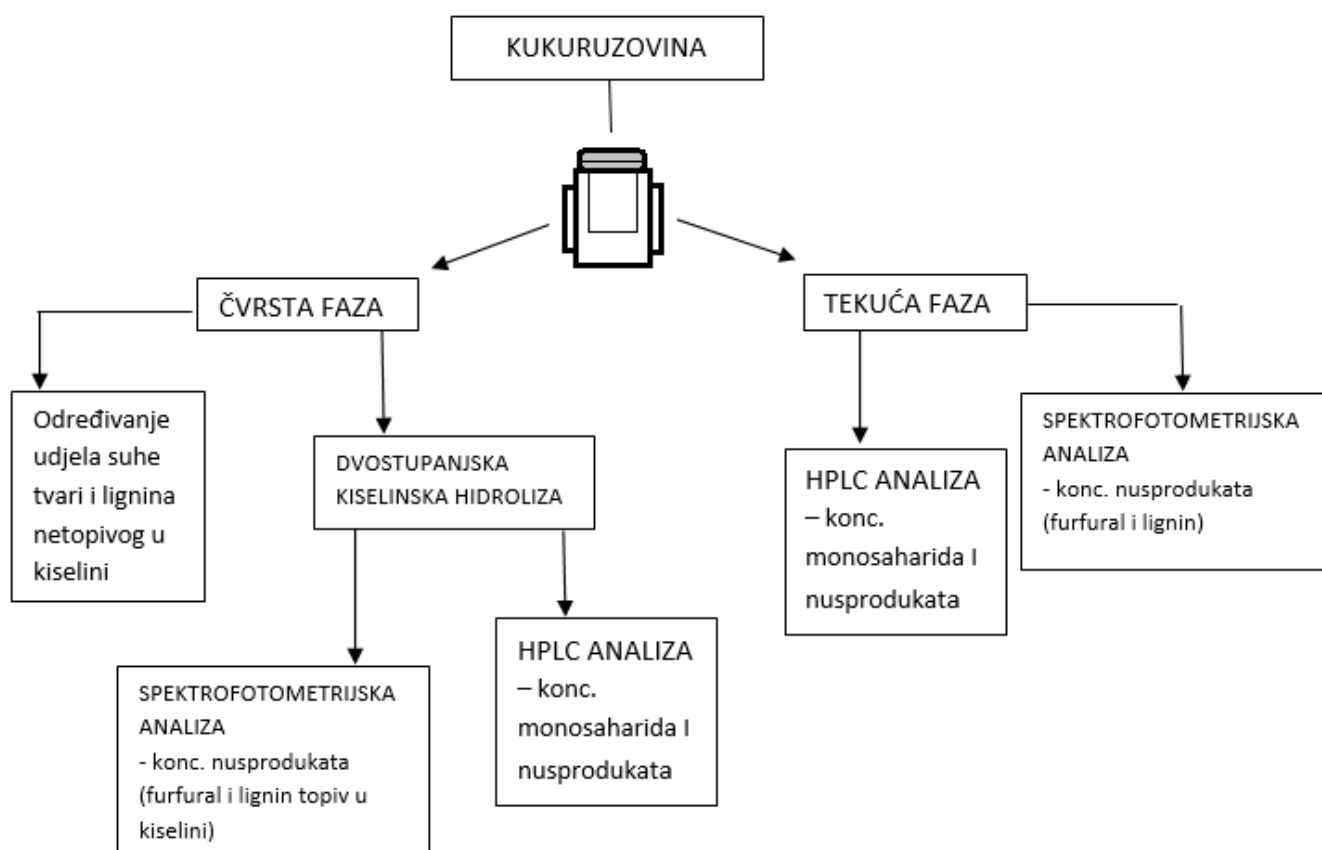
3.2.3. Tretman parom u uređaju za termičku predobradu lignoceluloznih sirovina

Odvagano je 500 g s. tv. kukuruzovine (s obzirom da je udio suhe tvari u kukuruzovini 92,61 %, odvagana masa iznosila je 539,898 g). Pripremljeno je 10 L 1 %-tne H_2SO_4 na način da je 57,5 ml 96 %-tne otopine H_2SO_4 razrijeđeno sa 9,940 L vodovodne vode, odnosno 10 L 0,5%-tne H_2SO_4 u posljednjem eksperimentu (28,75 mL kiseline + 9,97 L vodovodne vode). Odvagana masa kukuruzovine je prenesena u košaru unutar reaktora i zatim je dodan cijeli volumen pripremljene otopine 1 %-tne ili 0,5 %-tne H_2SO_4 . Na kontrolnoj jedinici se uključi

grijanje i prate se procesni parametri svakih 10 min sve dok se ne postignu zadani uvjeti. Napravljena su 4 eksperimenta,svaki pri različitim uvjetima procesa, kao što je opisano u poglavlju 4. Dobivene su 2 faze nakon svake predobrade – tekuća i čvrsta faza koja je svaka zasebno bila analizirana.

3.2.4. Analitičke metode

Shema postupka analize uzoraka nakon predobrade kukuruzovine prikazana je na slici 4.



Slika 7. Shema postupka analize kukuruzovine nakon predobrade u uređaju za termičku predobradu lignoceluloznih sirovina

3.2.4.1. Dvostupanjska kiselinska hidroliza

Dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom analizirani su kukuruzovina prije predobrade te uzorci čvrste faze nakon predobrade kako bi se utvrdila koncentracija monomernih šećera i lignina topljivog i netopljivog u kiselini. U tikvicu sa okruglim dnom dodano je po 0,4 g isprane, osušene i usitnjene čvrste faze pojedinog eksperimenta te je dodano 4 mL 72 %-tne H_2SO_4 , tikvice su ostavljene 1 h na temperaturi od 30°C . Nakon inkubacije u tikvice je dodano 112 mL demineralizirane vode tako da je koncentracija sulfatne kiseline iznosila 4 %. Uzorci su kuhani 4 sata uz povratno hladilo i povremeno miješanje kako bi se ostvario što bolji kontakt između predobrađene sirovine i kiseline. Nakon kuhanja su uzorci ohlađeni pod mlazom vode i profiltrirani kroz filter papir preko Buechnerovog lijevka. Zaostalom čvrstom dijelu na filter papiru je određen lignin netopljiv u kiselini, a u filtratu je određena koncentracija monosaharida, nusprodukata te lignina topljivog u kiselini.

3.2.4.2. Određivanje udjela suhe tvari u uzorcima sirovina

Za određivanje udjela suhe tvari koristile su se staklene petrijevke koje su se prije korištenja sušile u sušioniku 1 sat do konstantne mase, zatim hladile u eksikatoru 10-ak minuta i na kraju vagale na analitičkoj vagi. U izvagane petrijevke je odvagano po 25 g čvrste faze svake šarže te su posudice ostavljene u sušioniku 24 h. Nakon sušenja je izvagana masa petrijevke sa osušenom čvrstom fazom. Udio suhe tvari je izračunat prema formuli:

$$w(s. tv.) = \frac{m(\text{petrijevke nakon sušenja}) - m(\text{prazne petrijevke})}{m(\text{odvaganog uzorka})} * 100$$

3.2.4.3. Određivanje udjela lignina topljivog u kiselini

Određivanje je provedeno u filtratu nakon dvostupanjske hidrolize čvrste faze mjerenjem apsorbancije pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 205 nm. Udio lignina topljivog u kiselini ($w(LTK)$) je izračunat pomoću formule:

$$w(LTK) = \frac{A * D * V}{a * b * m} * 100$$

A - apsorbancija uzorka na 205nm

D - faktor razrjeđenja

V - volumen filtrata

a – konstanta, 110 g/Lcm

m – masa uzorka uzetog u analizu (0,4g)

3.2.4.4. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini

Netopljivi lignin (LNTK) se određuje vaganjem osušene čvrste faze koja je zaostala na filter papiru nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Udio se izračunava prema formuli:

$$w(LNTK) = \frac{m(\text{osušeni filter sa talogom}) - m(\text{filtera})}{m(\text{uzorka ČF uzetog u analizu})}$$

3.2.4.5. Određivanje furfurala spektrofotometrijski

Furfural se određivao u tekućoj fazi te u filtratu nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Za njegovo određivanje pomoću spektrofotometra je potreban baždarni pravac koji se predhodno napravi mjerenjem apsorbancija otopina furfurala poznatih koncentracija pri valnim duljinama od 284 i 320 nm. Nepoznati uzorak se razijeđuje demineraliziranom vodom te se mjeri apsorbancija na 284 nm i 320 nm (Martinez i sur., 2000). Koncentracija se određuje iz jednadžbe baždarnog pravca koji se nalazi na slici 13. u poglavlju 8.1. (Ivančić, 2016).

3.2.5. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

3.2.5.1. Priprema uzorka tekuće faze za analizu HPLC metodom

Volumenu od 700 μL neutraliziranog uzorka tekuće faze dodano je 700 μL 10 %-tne otopine cinkova sulfata heptahidrata. Uzorci su zatim snažno izmiješani tijekom 20-tak sekundi (mikser EV-100, Tehnica, Železniki, Slovenija) i ostavljeni da odstoje 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Dobiveni talog izdvojen je centrifugiranjem (10000 g, 5 min; HC-240, Tehnica, Železniki, Slovenija), a supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine 0,2 μm (Cromafil®Xtra PA(NY)-20 μm /25mm; Macherey-Nagel CoKG, Düren, Njemačka). Pripremljeni uzorci su analizirani pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustava (poglavlje 3.2.3.3.).

3.2.5.2. Priprema uzorka čvrste faze za analizu HPLC metodom

Filtrat dobiven dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom je neutraliziran dodatkom kalcijeva hidroksida (oko 0,4 g na 10 mL filtrata). Uzorak je zatim centrifugiran (5000 g, 5 min; HC-240, Tehnica, Železniki, Slovenija), a dobiveni supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine 0,2 μm (33 mm; Carl Roth, GmbH & Co, Karlsruhe, Njemačka). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustava (poglavlje 3.2.3.3.).

3.2.5.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu, Kyoto, Japan) korišten je za određivanje jednostavnih šećera glukoze, ksiloze, arabinoze i celebioze te nusprodukata mravlje, octene i levulinske kiseline u uzorcima čvrste i tekuće faze nakon predobrade kukuruzovine. Za analizu priređenih uzoraka korištena je modificirana kromatografska metoda opisana u radovima Trontel i sur. (2010, 2011a). Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina H_3PO_4 u demineraliziranoj vodi. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20 μL . Kromatografsko odijeljivanje provedeno je pri konstantnim uvjetima temperature predkolone i kolone (55°C) i protoka mobilne faze (0,5 mL min⁻¹). Za detekciju

spojeva korišten je detektor indeksa loma (RID). Procjena rezultata kromatografske analize napravljena je pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10 i pripadajuće vrijednosti su očitane iz baždarnih pravaca (Tablica 5.).

Tablica 5. Retencijska vremena i baždarni pravci.

spoj	t_R^* (min)	jednandžba baždarnog pravca	R^2 (-)
celobioza	$11,885 \pm 0,035$	$A = 221943 \cdot \gamma_{\text{celobioza}} + 838,98$	0,9999
glukoza	$14,045 \pm 0,040$	$A = 226208,50 \gamma_{\text{glukoza}} - 1433,13$	1,0000
arabinoza	$16,061 \pm 0,034$	$A = 225152 \gamma_{\text{arabinoza}} + 562,39$	0,9999
ksiloza	$14,834 \pm 0,037$	$A = 223510 \gamma_{\text{ksiloza}} + 1070,5$	1,0000
mravlja kiselina	$18,520 \pm 0,018$	$A = 82201 \gamma_{\text{mravlja kiselina}} - 125,4$	0,9983
octena kiselina	$19,825 \pm 0,026$	$A = 112445 \gamma_{\text{octena kiselina}} + 1276,1$	0,9989
levulinska kiselina	$21,388 \pm 0,051$	$A = 207915 \gamma_{\text{levulinska kiselina}} + 3222,5$	0,9998

* t_R izraženo kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija

3.2.5.3.1. Izrada baždarnog pravca za određivanje koncentracija šećera i kiselina

Otopine standarda pripravljene su kao otopine šećera (glukoze, ksiloze, arabinoze i celebioze) te nusprodukata mravlje, octene i levulinske kiseline u deioniziranoj vodi u koncentracijama: $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, 1 mg mL^{-1} , 2 mg mL^{-1} , 5 mg mL^{-1} , 10 mg mL^{-1} i 35 mg mL^{-1} . Uzorci su analizirani pomoću kromatografskog sustava Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu, Kyoto, Japan) uz tri ponavljanja. Za svaki uzorak određena je površina pika s obzirom na koncentraciju šećera u otopini.

Baždarni pravci za određivanje koncentracije šećera ,odnosno otopina kiselina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC metodom) nalaze se u poglavlju 8.2.

REZULTATI

4. REZULTATI

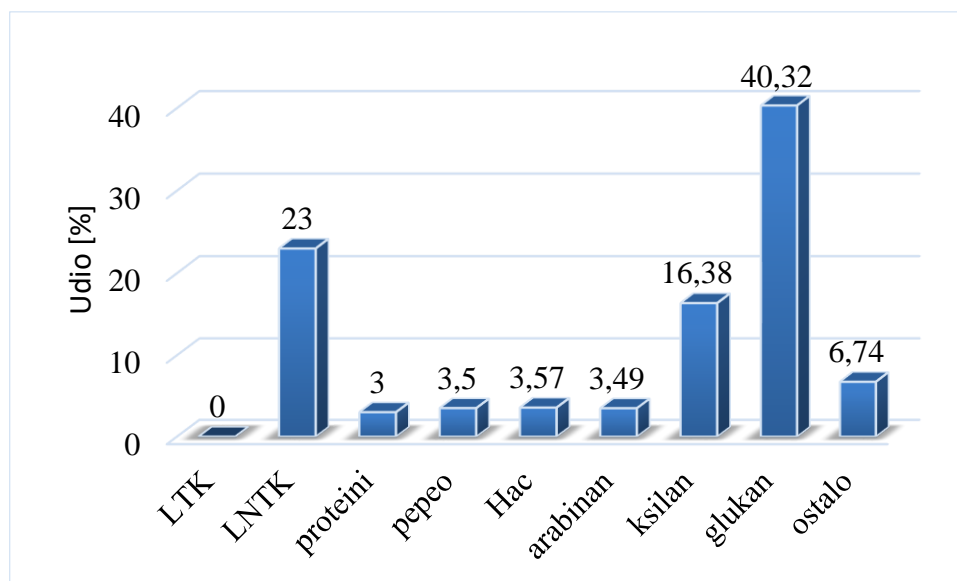
U ovom je radu određen sastav kukuruzovine i njenog hidrolizata nakon predtretmana u visokotlačnom reaktoru za predobradu lignoceluloznih sirovina pri različitim uvjetima procesa. Kao katalizator hidrolize je korištena sumporna kiselina u koncentraciji do 1 %. Predobrada je provedena u rasponu vremena zadržavanja od 1 do 10 minuta pri konstantnom tlaku i temperaturi. Provedena su četiri predtretmana, tri predtretmana pri 210°C i 20 bara tijekom 1, 5 i 10 minuta. Uvjeti pri kojima je postignuta najveća koncentracija ukupnih ugljikohidrata (glukoze, ksiloze i arabinoze) korišteni su za provođenje zadnjeg predtretmana, ali pri nižoj koncentraciji kiseline od 0,5 %.

Rezultati eksperimenata podijeljeni su u tri poglavlja te su prikazani kao udjeli šećera i nusprodukata u tekućoj, odnosno udjeli šećera i nusprodukata u čvrstoj fazi izraženih kao % suhe tvari sirovine.

- i) analiza sastava lignocelulozne sirovine – kukuruzovine (poglavlje 4.1)
- ii) analiza tekuće faze hidrolizata kukuruzovine pri različitim uvjetima (poglavlje 4.2.)
- iii) analiza čvrste faze hidrolizata kukuruzovine pri različitim uvjetima (poglavlje 4.3.)

4.1. Analiza kukuruzovine

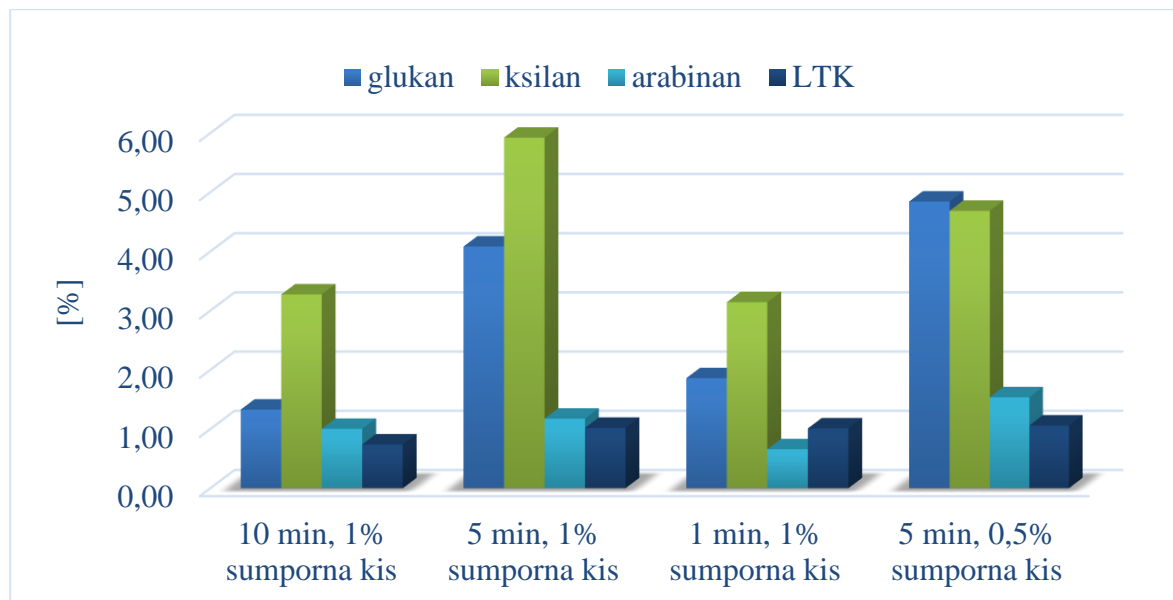
Analiza kukuruzovine provedena je metodom dvostupanjske kiselinske hidrolize kako je opisano u poglavlju 3.2.3.1. Dobiveni rezultati su prikazani na slici 8.



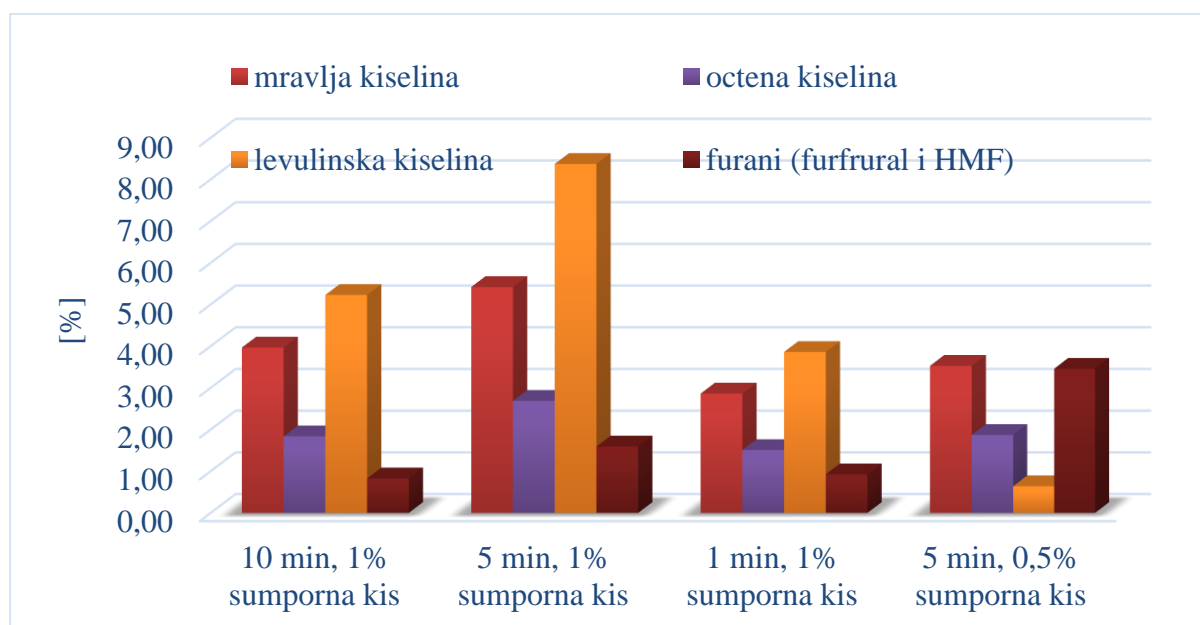
Slika 8. Sastav kukuruzovine dobiven nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize (udio proteina preuzet iz Hanžek, 2015., LTK: lignin topljiv u kiselini, LNTK: lignin netopljiv u kiselini)

4.2. Analiza tekuće faze hidrolizata kukuruzovine

Analiza tekuće faze provedena je predhodno opisanim postupcima u poglavljima 3.2.4. i 3.2.5. Rezultati su prikazani na slikama 9. i 10.



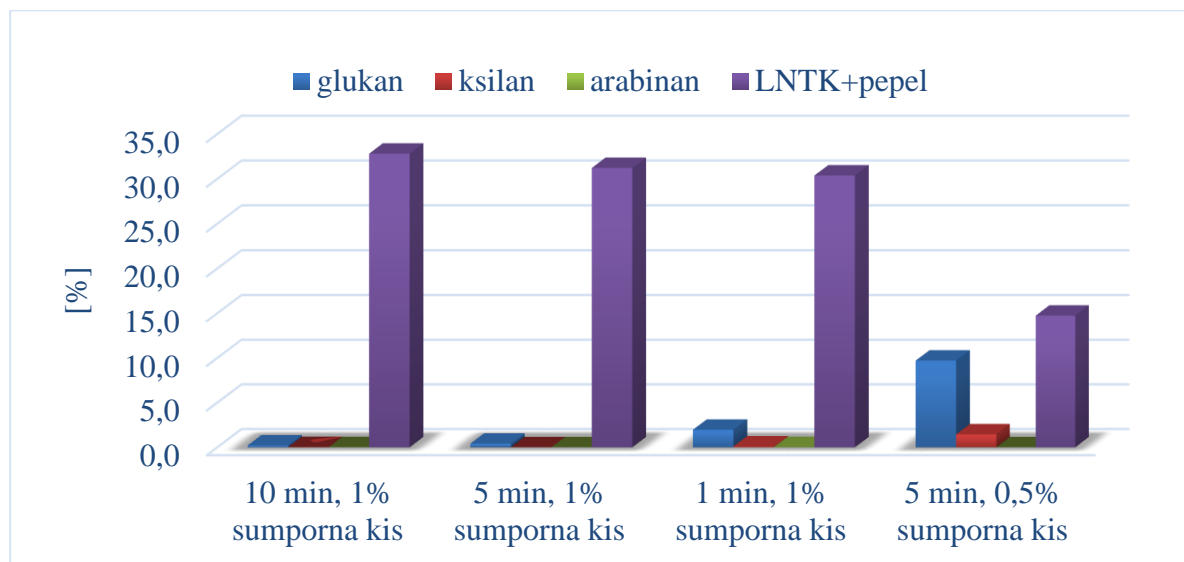
Slika 9. Udio glukana (■), ksilana (■), arabinana (■), i LTK (■) tekućoj fazi hidrolizata kukuruzovine nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru kod različitih uvjeta



Slika 10. Udio mravlje kiseline (■), octene kiseline (■), levulinske kiseline (■) i furana (■) u tekućoj fazi hidrolizata kukuruzovine nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru kod različitih uvjeta

4.3. Analiza čvrste faze hidrolizata kukuruzovine

Analiza čvrste faze prevedena je na način opisan u poglavljima 3.2.4. Dobiveni rezultati analize su prikazani na slici 11.



Slika 11. Udio glukana (■), ksilana (■), arabinana (■) i LNTK + pepela (■) u čvrstoj fazi hidrolizata kukuruzovine nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru kod različitih uvjeta



Slika 12. Udio mravlje kiseline (■), octene kiseline (■), levulinske kiseline (■) i furana (■) u čvrstoj fazi hidrolizata kukuruzovine nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru kod različitih uvjeta

RASPRAVA

5. RASPRAVA

5.1. Analiza kukuruzovine

U ovom je radu proveden predtretman kukuruzovine termičkom obradom u visokotlačnom reaktoru za predobradu lignocelulozne sirovine. Cilj je bio odrediti uvjete procesa pri kojima se ostvaruje najveći prinos fermentabilnih šećera, a najmanji nusprodukata koji usporavaju ili inhibiraju proces proizvodnje bioetanola.

U prvom dijelu eksperimenta provedena je analiza lignocelulozne sirovine kako bi se utvrdio njezin sastav. Analiza je provedena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize kukuruzovine. Kukuruzovina je prema dobivenim rezultatima sadržavala: 40,32 % glukana, 16,38 % ksilana i 3,49 % arabinana što ukupno čini 60,19 % ugljikohidrata u sirovini. Dobiveni udjeli glukana i ksilana su skladu sa vrijednostima navedenim u literaturi u kojoj se udio glukana u suhoj tvari nalazi u rasponu od 6.9-48.0 %, ksilana 13.4-25.0 % i arabinana 1,7-6,1 %. Osim ugljikohidrata, kukuruzovina je sadržavala 23% lignina netopljivog u kiselini (LNTK) te zanemarivo malu količinu lignina topljivog u kiselini (LTK), što se također nalazi u granicama vrijednosti navedenih u literaturi, 14,3-26 % suhe tvari kukuruzovine (Pordesimo i sur., 2005; Lee i sur., 2007). Od ostalih spojeva određeno je 3,57 % octene kiseline, 3 % proteina (Hanžek, 2015.) te 3,5 % pepela. Preostalih 6 % otpada na sve ostale spojeve koji nisu eksperimentalno određeni.

5.2. Analiza tekuće faze hidrolizata kukuruzovine

Tekuća faza dobivena nakon predobrade kukuruzovine je analizirana spektrofotometrijski, pri čemu je određena koncentracija ukupnih furana i lignina topljivog u kiselini. Pomoću HPLC analize je određena koncentracija monomernih ugljikohidratnih jedinica (glukoze, ksiloze i arabinoze) koji su u rezultatima (poglavlje 4.2.) izraženi kao pripadajući polimeri te je određena koncentracija nusprodukata (levulinske, mravlje i octene kiseline).

Nakon predobrade je udio lignina topljivog u kiselini pri različitim vremenima zadržavanja (10/5/1min) podjednak te se nalazi u rasponu od 0,7 do 1,1 % s.tv. sirovine, dok udjeli šećernih polimera variraju. Pri vremenu zadržavanja od 10 min dobiven je najmanji udio glukana (1,3 % s.tv. sirovine), a ksilana je dobiveno približno jednako kao pri zadržavanju od 1 minute (3,1 do 3,3 % s.tv.). Skraćivanjem vremena zadržavanja na 5 minuta postignuti su najbolji rezultati

zbog toga što je dobiven najveći udio glukana (4,1 %), ksilana (5,9 %) i arabinana (1,2 %), što je u skladu sa činjenicom da produljenim izlaganjem šećera na visokoj temperaturi dolazi do njihove razgradnje na pojedine nusprodukte kao što je opisano u poglavlju 2.3. Sa druge strane, zadržavanje u trajanju od 1 minute bilo je prekratko za adekvatnu hidrolizu celuloze i hemiceluloze na već spomenute pentoze i heksoze, zbog čega je pri tim uvjetima i nastao manji udio glukana (1,9 %), ksilana (3,1 %) i arabinana (0,7 %).

S obzirom da je pri vremenu zadržavanja od 5 min i uvjetima (210°C/20bar/1% H₂SO₄) dobiven najveći postotak fermentabilnih šećera, posljednji eksperiment je proveden pri istom vremenu i temperaturi zadržavanja, ali je kao katalizator korištena 0,5 %-tna otopina H₂SO₄. Konačno, u tim su uvjetima postignuti najbolji rezultati, dobiven je najveći udio glukana (4,8 %), nešto manje ksilana (4,7 %) i najviše arabinana (1,5 %). Osim povećanja udjela šećera, smanjivanjem koncentracije kiselinskog katalizatora, manje je furana razgrađeno na levulinsku (0,6 %) i mravlju kiselinu (3,5 %), nastalo je i manje octene kiseline (1,9 %), a sukladno smanjenju mase levulinske i mravlje kiseline u hidrolizatu je ostao nešto veći udio furana (3,5 %) sve izraženo kao udio s.tv., kao što se vidi na slici 10., priloženoj u poglavlju 4.2.

U usporedbi sa rezultatima u literaturi u kojima je proveden tretman parom uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta pri 210°C i 0,5 % H₂SO₄ u tekućoj fazi dobiveno je 0,8 % više glukana, 7,4 % manje ksilana te 0,4 % manje arabinana (Varga i sur., 2004). Ako uspoređujemo udio nusprodukata u tekućoj fazi, nastalo je 1 % više furana, 2 % manje octene te 3 % više mravlje kiseline. (Bondesson, 2013). Predhodno navedeno pokazuje da postupak predobrade treba biti u identičnim uvjetima, ali da i razlika u sastavu korištene sirovine zbog različite sorte kukuruza i područja na kojem je kukuruz uzgojen utječe na konačan rezultat istraživanja.

5.4. Analiza čvrste faze hidrolizata kukuruzovine

U čvrstoj fazi hidrolizata kukuruzovine određeni su udjeli fermentabilnih šećera, nusprodukata i lignina netopljivog i topljivog u kiselini na način opisan u poglavlju 3.2.4. U prva 3 eksperimenta provedena pri različitim vremenima zadržavanja, istoj temperaturi i 1 %-tnoj H₂SO₄ dobiveni su zanemarivo mali udjeli glukana, ksilana i arabinana (sve u rasponu od 0 do 2,0 % s.tv. sirovine), što ukazuje na to da su oni skoro potpuno zaostali otopljeni u tekućoj fazi hidrolizata kukuruzovine. Za razliku od toga u posljednjem eksperimentu provedenom uz 0,5 %-tnu H₂SO₄ pri zadržavanju od 5 minuta registrirano je povećanje udjela fermentabilnih šećera, dobiveno je 9,7 % glukana te 1,4 % ksilana. U čvrstoj fazi hidrolizata kukuruzovine

zaostala je cjelokupna masa lignina netopljivog u kiselini zajedno sa pepelom, najveći udjel od 32,8 % zabilježen je kod 10 minuta zadržavanja s 1 % H_2SO_4 , a najmanji kod 5 minuta zadržavanja s 0,5 % H_2SO_4 (14,7 %).

Količina nusprodukata u čvrstoj fazi hidrolizata kukuruzovine bila je zanemarivo mala pri svim uvjetima osim pri zadržavanju od 5 minuta uz 0,5 %-tnu sumpornu kiselinu kao katalizator. U tom je slučaju u uzorku zaostalo 1,6 % mravlje kiseline što je moguća posljedica lošeg ispiranja uzorka vodom, odnosno analitičkih pogrešaka.

ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata opisanih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Analizom je utvrđen sljedeći sastav kukuruzovine: 40,32 % glukana, 16,38 % ksilana, 3,49 % arabinana, 23 % lignina netopljivog u kiselini, 3,57 % octene kiseline te 3,5 % pepela.
2. Postupak predobrade kukuruzovine kod 210°C/20bara uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta i 0,5 % H₂SO₄ kao katalizator pokazao se kao najuspješniji jer su dobivene najveće koncentracije fermentabilnih šećera (ukupnog udjela 11,1 %) uz relativno mali udjel nusprodukata predobrade u tekućoj fazi hidrolizata.
3. Povećanje koncentracije H₂SO₄ i produljenje vremena zadržavanja tijekom termalne predobrade povezano je sa smanjenjem udjela fermentabilnih šećera, odnosno s povećanjem udjela nusprodukata postupka predobrade.
4. Na osnovi rezultata ovog istraživanja jasno je da je potrebno provesti daljnju optimizaciju procesa predobrade kukuruzovine s ciljem dobivanja većeg udjela fermentabilnih šećera.

LITERATURA

7. LITERATURA

1. Almeida, J.R.M., Modig T., Petersson A., Hähn-Hägerdal B., Lidén G., Gorwa-Grauslund, M.F. (2007) Increased Tolerance and Conversion of Inhibitors in Lignocellulosic Hydrolysates By *Saccharomyce Cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82-4.
2. Alriksson B, Sjöde A, Nilvebrant, N.O, Jönsson LJ. (2006) Optimal conditions for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. *Appl Biochem. Biotechnol.* 129–132,599–611.
3. Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* **101**(13), 4851-4861.
4. Anwar, Z., Gulfranz M, Irshad M. (2014) Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **7**(2), 163-173.
5. Baugh, K.D., Levy, J.A., McCarty, P.L. (1988) Thermochemical pretreatment of lignocellulose to enhance methane fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **31**(1), 50-70.
6. Bondesson, P-M, Galbe M., and Zacchi G. (2013) Ethanol and biogas production after steam pretreatment of corn stover with or without the addition of sulphuric acid. *Biotechnol. Biofuel.* 6:11
7. Demirbas, A. (2005). Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass. *Energy Source.* **27**, 327–337.
8. Dottori, F.A., Benson, R.A.C., Benech, R.O. (2013) Two-stage continuous pretreatment of lignocellulosic biomass. Patent no: WO2013013318.
9. Eggeman and Elander (2005) Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* **96**(18), 2019-25.
10. Fengel D., Wegener G. (1984) *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. De Gruyter, Berlin str 23-48, 57-64, 66, 71-103.
11. Hamelinck, C. N., Hooijdonk G., Faaij, A.P.C (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass. Bioen.* **28**, 384–410.
12. Han, M., Moon, S., Kim, Y. (2009) Bioethanol production from ammonia percolated wheat straw, *Biotechnol Bioproc.* **14**, 606-11.

13. Hanžek M. (2015) Utjecaj alkalne obrade kukuruznih oklasaka na udjele lignina i celuloze. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
14. Ivančić F. (2016) Predobrada pšenične slame za proizvodnju bioetanola, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
15. Jiang T, Qiao H, Zheng Z, Chu Q, Li X, Yong Q, Ouyang J. (2016) Lactic acid production from pretreated hydrolysates of corn stover by a newly developed *Bacillus coagulans* strain. U: PLoS ONE (Yang S., ured.) **11**(2):e0149101. doi:10.1371/journal.pone.0149101
16. Jönsson, L.J., Alriksson B., Nilvebrant, N.O. (2013): Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuel.* **6**:16.
17. Kavanagh, K.R., Pepper, J.M. (1995) *Can. J. Chem.* **33**, 24.
18. Kleinert, M., Barth, T. (2008). Toward a lignocellulosic biorefinery: Direct onestep conversion of lignin to hydrogen-enriched biofuel. *Energy Fuel.* **22**, 1371–1379.
19. Knauf M., Moniruzzaman M. (2004) Lignocellulosic biomass processing. *Persp. Int. Sugar. J.* **106**, 147-50.
20. Kovacs K., Macrelli S., Szakacs G., Zacchi G. (2009) Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnol. Biofuel.* **2**, 14.
21. Lee D., Owens, V.N., Boe A., Jeranyama P. (2007) Composition of Herbaceous Biomass Feedstocks. North Central Sun Grant Center, South Dakota State University, Box 2140C, Brookings, SD 57007
22. Limayema A., Ricke, S.C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. En. Combust. Sci.* **38**, 449-467.
23. Lopez, M. J., Vargas-Garcia, M.D., Suarez-Estrella F., Nichols, N.N., Dien, B.S., Moreno J. (2007). Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 794–800.
24. Martinez, A., Rodriguez, M.E., York, S.W., Preston, J. F., Ingram, L.O. (2000) Use of UV Absorbance To Monitor Furans in Dilute Acid Hydrolysates of Biomass. *Biotechnol Progress.* **16**, 637–641.

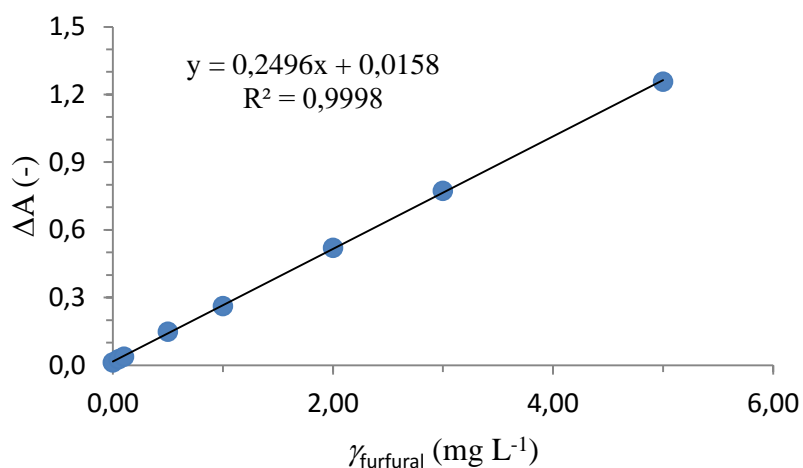
25. Monlau F., Barakat A., Trably E., Dumas C., Steyer J.P., Carrère H. (2013) Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* **43**:3, 260-322.
26. Ohgren K., Rudolf A., Galbe M., Zacchi G. (2006) Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass Bioen.* **30**, 863–869.
27. Ohman M., Boman C., Hedman H., Eklund R. (2006). Residential combustion performance of pelletized hydrolysis residue from lignocellulosic ethanol production. *Energy Fuel.* **20**, 1298–1304.
28. Pettersen RC (1984) The chemical composition of wood. The chemistry of solid wood. American Chemical Society, Washington, DC, **207**, 115-6.
29. Pordesimo, L.O., Hames, B.R., Sokhansanj S., Edens, W.C. (2005). Variation in corn stover composition and energy content with crop maturity. *Biomass Bioen.* **28**(4), 366-374.
30. Pointner M., Kuttner P., Obrlik T., Jäger A., Kahr H. (2014) Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agron. Res.* **12** (2), 391-396.
31. Ragauskas A. (2014.), Materials for biofuels. *World Scientific*. str. 81-84.
32. Ramos, L.P. (2003) The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova.* **26** (6), 863–871.
33. Rezić T. (2012), Interna skripta iz modula Biotehnologija III, Industrijska biotehnologija, Biotehnološka proizvodnja biogoriva, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Zagreb, str. 1-21.
34. Rowell, R.M., Pettersen R., Han, J.S., Rowell, J.S., Tshabalala, M.A. (2005) Cell wall chemistry. U: Handbook of wood chemistry and wood composites, (Rowell, R.M. ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 35-74.
35. Saha, B.C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**(5), 279–291.
36. Saritha M., Arora A. (2012) Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. *Indian J Microbiol.* **52**, 122-130.
37. Sarkar N., Ghosh, S.K., Bannerjee S., Aikat K. (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy.* **37**, 19-27.

38. Sheehan J., Aden A., Paustian K., Killian K., Brenner J., Walsh M., Nelson R. (2004) Energy and Environmental Aspects of Using Corn Stover for Fuel Ethanol. Massachusetts Institute of Technology and Yale University. **7**, 3–4.
39. Sluiter, J.B., , Ruiz, R.O., Scarlata C. , Sluiter A., Templeton D. (2010) Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks: 1. Review and Description of Methods. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9043–9053.
40. Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* **83**, 1-11.
41. Varga E., Reczey K., Zacchi G. (2004) Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Appl Biochem Biotechnol.* **113**, 509–523.

PRILOZI

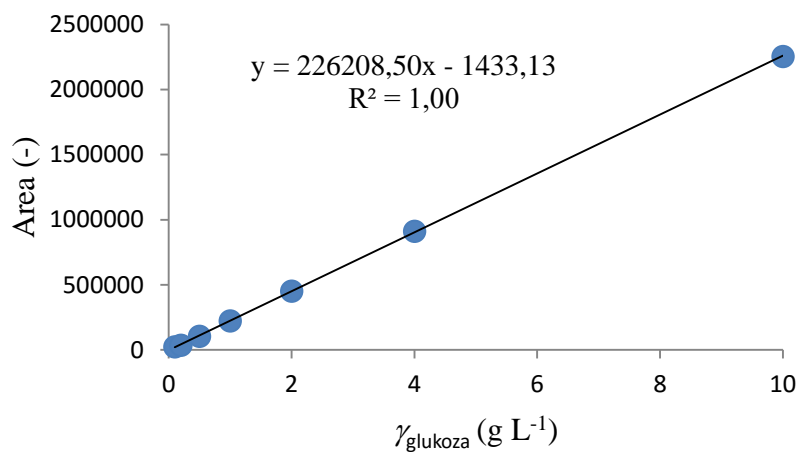
8. PRILOZI

8.1. Baždarni pravac za određivanje ukupnih furana

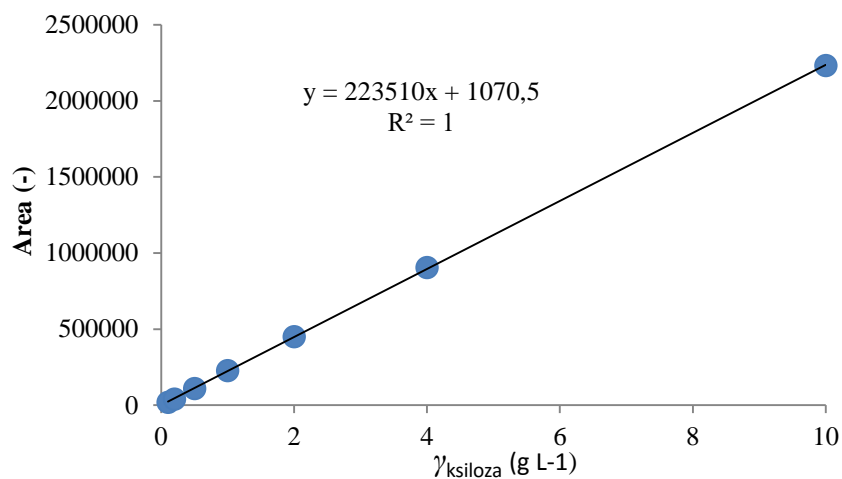


Slika 13. Baždarni pravac za određivanje koncentracije ukupnih furana (Ivančić, 2016)

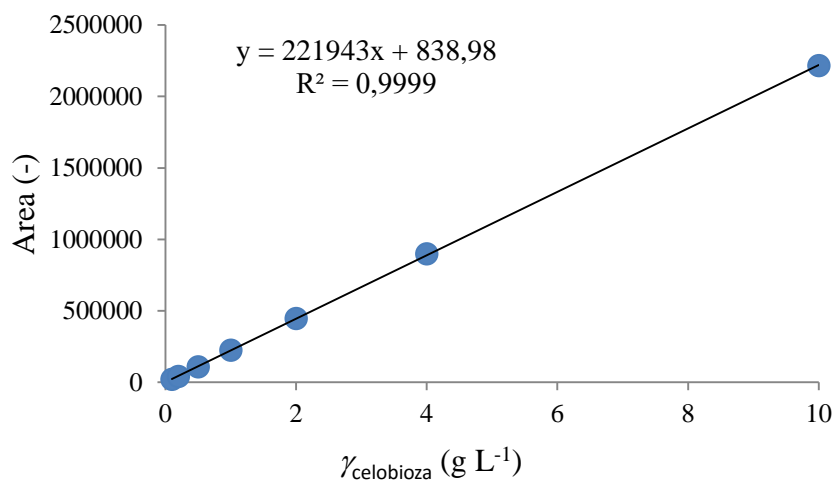
8.2. Baždarni pravci za određivanje pojedinih šećera i kiselina



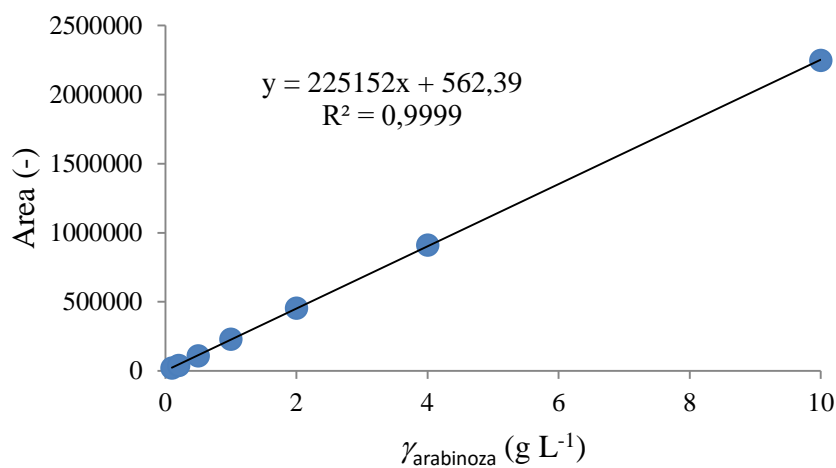
Slika 14. Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze



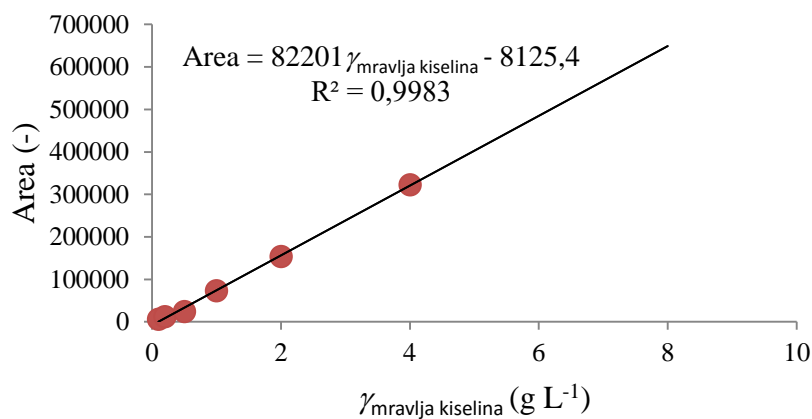
Slika 15. Baždarni pravac za određivanje koncentracije ksiloze



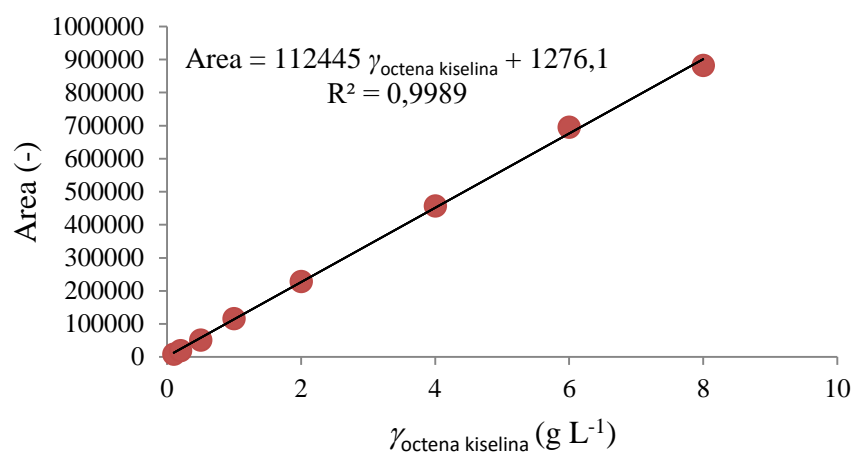
Slika 16. Baždarni pravac za određivanje koncentracije celebioze



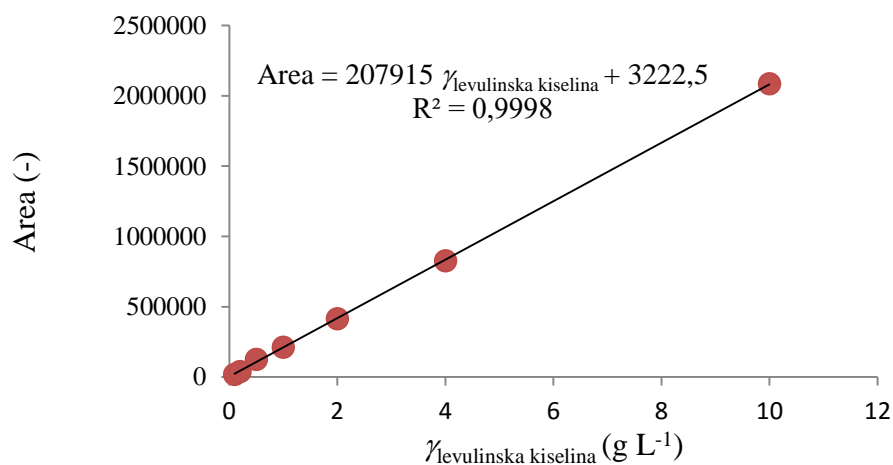
Slika 17. Baždarni pravac za određivanje koncentracije arabinoze



Slika 18. Baždarni pravac za određivanje koncentracije mravlje kiseline



Slika 19. Baždarni pravac za određivanje koncentracije octene kiseline



Slika 20. Baždarni pravac za određivanje koncentracije levulinske kiseline